

УДК 599.32:615.745.1:613.84]-092.4  
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i3.8197

П. Г. Лихацький

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

## КОРЕКЦІЯ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В ЩУРІВ, ОТРУЄНИХ НАТРІЮ НІТРИТОМ І ТЮТЮНОВИМ ДИМОМ, ПРЕПАРАТОМ “МІЛДРОНАТ”

**Вступ.** За оцінкою ВООЗ, куріння посідає друге місце в списку причин, які викликають передчасну загибель людей. Зацікавленість у з'ясуванні механізмів дії на організм нітритів та нітратів і ланок патогенезу гемічної гіпоксії, яка при цьому виникає, зумовлена їх широким використанням у промисловості, сільському господарстві та медицині. Тому дослідження поєднаного впливу декількох ксенобіотиків на організм є доцільним та актуальним.

**Мета дослідження** – оцінити ефективність використання антигіпоксанта “Мілдронат” і його вплив на окиснювальні та біоенергетичні процеси в організмі щурів різного віку, уражених натрію нітритом на тлі 45-денної тютюнової інтоксикації.

**Методи дослідження.** За умов ураження щурів різного віку натрію нітритом на тлі тютюнової інтоксикації в крові визначали вміст мет- та карбоксигемоглобіну. Активність процесів ліпопероксидації оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів у сироватці крові, легенях та міокарді піддослідних тварин, функціонування біоенергетичних процесів – за активністю сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази.

**Результати й обговорення.** Встановлено, що ураження щурів різних вікових груп натрію нітритом (за 24 та 72 год до закінчення експерименту) на тлі 45-денної інтоксикації тютюновим димом призводило до активації процесів вільнорадикального окиснення, на що вказувало збільшення вмісту метгемоглобіну в крові уражених тварин і ТБК-активних продуктів у сироватці крові, легенях та міокарді після отруєння. Одночасно у крові зростав вміст карбоксигемоглобіну. В організмі виникала змішана гіпоксія (гемічна та циркуляторна), яка призводила до порушення функціонування мітохондріального ланцюга окиснення. Найчутливішими до дії досліджуваних токсикантів виявились статевонезрілі щури, в міокарді старечих тварин спостерігали вірогідні зміни активності мітохондріальних ензимів після ураження, які були більш вираженими порівняно з іншими віковими групами щурів. З метою корекції виявлених порушень застосовано препарат метаболічної дії з антигіпоксантами властивостями “Мілдронат”, який позитивно вплинув на активність процесів ліпопероксидації та активність мітохондріальних ензимів за умов гіпоксії.

**Висновок.** Отримані результати вказують на доцільність включення мілдронату до комплексного лікування отруєнь різного генезу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** тютюновий дим; натрію нітрит; метгемоглобін; карбоксигемоглобін; ліпопероксидація; мітохондріальні ензими.

ВСТУП. Забруднення навколишнього середовища хімічними сполуками призвело до виникнення раніше не відомих хронічних захворювань і патологічних станів. Індукована екологічна патологія найчастіше розвивається під впливом конкретних шкідливих для організму хімічних забруднювачів – солей важких металів, пестицидів, простих полієфірів, гербіцидів, детергентів та ін. Значною екологічною та медико-біологічною проблемою в аграрно-промислових регіонах України є комбінована дія на організм людини і тварин неорганічних нітросполук, що

© П. Г. Лихацький, 2017.

супроводжується випадками нітратно-нітритних інтоксикацій. Надходження в організм нітратів і нітритів зумовлює утворення надмірної кількості оксиду азоту (NO), який здатний ініціювати ланцюгові вільнорадикальні реакції. При цьому з'являються передумови для утворення інших активних форм нітрогену (пероксинітриту,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$  та ін.), що можуть викликати гіпоксичний і вільнорадикальний некробіоз [1, 2].

Під впливом натрію нітриту першою ланкою патогенезу є гемоглобін [3]. Дія натрію нітриту проявляється перш за все в окисненні оксигемоглобіну до метгемоглобіну та різкому зростан-

ні інтенсивності вільнорадикальних реакцій [4]. Різке збільшення у клітині вмісту проміжних продуктів відновлення кисню позначається на функціонуванні дихального ланцюга мітохондрій та організму загалом [5]. Відповіддю на дію зовнішнього чинника (індуктора гіпоксії) є зміна енергетичного обміну в клітині, що суттєво залежить від вихідного стану мітохондрій [6].

На сьогодні в медичному світі досить гостро стоїть проблема поєднаної патології. У повсякденному житті людина піддається впливу декількох токсичних чинників, що призводить до загального отруєння організму. Значну роль у розвитку патології відіграють і шкідливі звички – тютюнокуріння, зловживання алкоголем та медикаментозними засобами. Активне і пасивне куріння тютюну може викликати утворення активних форм кисню (пероксиду водню, епоксидів, NO, двоокису азоту, пероксинітриту (ONOO)) [7–10]. Останні активують процеси вільнорадикального окиснення в організмі, зокрема пероксидного окиснення ліпідів [11]. З'являється все більше доказів того, що компоненти сигаретного диму погіршують мітохондріальну функцію і спричиняють мітохондріальний оксидативний стрес у різних типах клітин [9, 10]. Як показали результати нещодавно проведених досліджень, акролеїн, головний токсикант у сигаретному димі, викликає окиснювальне пошкодження мітохондрій [12, 13], що зумовлює пригнічення активності мітохондріальних ензимів.

Мета дослідження – оцінити ефективність впливу мілдронату на процеси вільнорадикального окиснення та активність мітохондріальних ензимів у щурів, уражених натрію нітритом на тлі 45-денної інтоксикації тютюновим димом.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** В експериментах використовували білих безпородних щурів-самців, яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. Тварин було поділено на три вікові категорії: статевонезрілі, статевозрілі та старечі. Кожна вікова група складалася з двох підгруп – інтактний контроль та дослідна група. Щурів дослідних груп протягом 45 днів піддавали впливу тютюнового диму (ТД). Піддослідних тварин поділили ще на три групи. Щурам 1-ї групи за 24 год до закінчення експерименту вводили натрію нітрит (НН) у дозі 45 мг/кг маси тіла, 2-ї – натрію нітрит за 72 год до евтаназії, тварин 3-ї групи піддавали токсичному впливу тільки тютюнового диму. Щурам ще двох груп після ураження обома токсикантами інтрагастрально вводили препарат “Мілдронат” (Мельдоній) (виробник “Grindex”, Латвія) у дозі 120 мг/кг маси тіла протягом 30 днів

(починаючи з 15 дня інтоксикації тютюновим димом і щодня до кінця експерименту). Модель залежності від хронічної дії тютюнового диму створювали за допомогою герметичної камери об'ємом 30 л, що дозволило обкурювати тварин у вільній поведінці. Тютюновий дим, що утворювався від горіння 6 сигарет “Прима срібна (синя)” (з вмістом 0,6 мг нікотину та 8 мг смоли), через отвори у камері подавали всередину неї. У камері одночасно перебувало 6 тварин протягом 6 хв. Тварини контрольної групи також знаходились протягом 6 хв у герметичній камері, але не підлягали дії тютюнового диму.

Через 45 діб від початку ураження тварин тютюновим димом їх виводили з експерименту шляхом евтаназії під тіопенталовим наркозом.

Для дослідження брали кров, сироватку крові, легені та міокард уражених тварин. Із досліджуваних тканин готували 10 % гомогенат на ізотонічному розчині.

У крові визначали вміст метгемоглобіну (MetHb) в реакції з ацетонціангідрином [14] та карбоксигемоглобіну (HbCO) в реакції з гексаціанфератом(III) калію [15]. Активність процесів ліпопероксидації оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [16] у сироватці крові, легенях та міокарді піддослідних тварин, функціонування біоенергетичних процесів – за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ), яку вивчали за реакцією відновлення ферриціаніду калію, розчин якого має жовте забарвлення, до безбарвного ферроціаніду калію сукцинатом під дією СДГ [17] та цитохромоксидази (ЦО) за реакцією окиснення диметил-п-фенілендіаміну [18].

При виконанні досліджень користувались загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001) та узгодженими з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, Франція, 1986) [19]. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми STATISTICA 6,0 з використанням параметричного критерію ANOVA та непараметричного критерію Вілкоксона для зв'язаних вибірок. Зміни вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$  [20].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Окис вуглецю, або чадний газ, що міститься в тютюновому димі, має властивість зв'язувати дихальний пігмент крові – гемоглобін [21]. Утворений при цьому карбоксигемоглобін не здатний переносити кисень, у результаті порушуються процеси тканинного дихання. Встановлено, що при вику-

рюванні пачки сигарет людина вводить в організм понад 400 мл чадного газу, внаслідок чого концентрація карбоксигемоглобіну в крові зростає до 7–10 % [21–23].

Після ураження щурів різних вікових груп тютюновим димом протягом 45 днів спостерігали підвищення вмісту MetHb, яке найбільш вираженим було у старечих тварин (табл. 1).

Отруєння токсикованих димом тварин натрію нітритом за 24 год до закінчення експерименту викликало вірогідне підвищення вмісту даного показника у всіх вікових групах. Ще більшого значення він досягнув у щурів, яким натрію нітрит вводили за 72 год до припинення інтоксикації димом (45-та доба). Так, у статевонезрілих тварин вміст MetHb у цей термін підвищився у 3,3 раза, у статевозрілих – у 2,7 раза, у старечих – у 2,9 раза. Застосування мілдронату призвело до зниження даного показника, яке вірогідним ( $p \leq 0,05$ ) виявилось тільки у статевонезрілих щурів (вміст MetHb зменшився на 52 % у кінці експерименту). В інших двох групах спостерігали тенденцію до зниження вмісту метгемоглобіну після введення мілдронату в уражений двома токсикантами організм.

Ми дослідили вміст HbCO у крові щурів після ураження тютюновим димом. Відмічено, що 45-денне отруєння ТД призвело до вірогідного підвищення цього показника у всіх вікових групах (табл. 2). Найчутливішими до дії ТД виявились статевонезрілі тварини, в яких вміст HbCO після тютюнової інтоксикації у 2,75 раза був більшим від рівня інтактних щурів. Водночас у крові статевозрілих тварин він перевищував норму в 1,5 раза, у старечих – у 2 рази.

Після введення ураженим димом тваринам натрію нітриту (за 24 год до закінчення експерименту) вміст HbCO підвищився ще більше у всіх вікових групах, і на кінець експерименту (за 72 год введення НН до кінця тютюнової інтоксикації) цей показник зріс у статевонезрілих тварин у 3 рази, у статевозрілих – в 1,5 раза, у старечих – у 2,3 раза. Найстійкішими щодо даного показника були статевозрілі щури. Застосування мілдронату призвело до вірогідного зниження вмісту карбоксигемоглобіну в усіх вікових групах тварин в обидва досліджувані терміни, хоча рівня норми він не досягнув.

З огляду на результати попередніх наших досліджень, доцільним було оцінити ефектив-

Таблиця 1 – Вміст метгемоглобіну (г/л) у крові щурів, уражених натрію нітритом на тлі 45-денної інтоксикації тютюновим димом та після застосування мілдронату ( $M \pm m$ ,  $n=108$ )

Термін дослідження, доба	Група піддослідних тварин		
	статевонезрілі щури	статевозрілі щури	старечі щури
Інтактні щури	1,53±0,14	1,50±0,15	1,41±0,07
45-та доба ураження ТД	2,04±0,13*	2,29±0,08*	2,49±0,15**
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН	4,53±0,15***	3,64±0,09***	3,98±0,11***
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН+мілдронат	3,76±0,09#	3,52±0,05	3,64±0,09
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН	5,02±0,18***	4,01±0,20**	4,10±0,17***
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН+мілдронат	4,22±0,16#	3,68±0,12	3,70±0,07

Примітки. Тут і в таблицях 2–4 та на рисунках 1, 2:

- Вірогідні зміни між інтактними тваринами та щурами, ураженими токсикантами: \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ .
- Вірогідні зміни між тваринами, ураженими токсикантами, та щурами після корекції мілдронатом: # –  $p \leq 0,05$ ; ## –  $p \leq 0,01$ ; ### –  $p \leq 0,001$ .

Таблиця 2 – Вміст карбоксигемоглобіну (г/л) у крові щурів, уражених натрію нітритом на тлі 45-денної інтоксикації тютюновим димом та після застосування мілдронату ( $M \pm m$ ,  $n=108$ )

Термін дослідження, доба	Група піддослідних тварин		
	статевонезрілі щури	статевозрілі щури	старечі щури
Інтактні щури	0,0148±0,0012	0,0207±0,0016	0,0188±0,0017
45-та доба ураження ТД	0,0408±0,0033*	0,0315±0,0023*	0,0385±0,0036*
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН	0,0428±0,0040**	0,0328±0,0028*	0,0408±0,0026**
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН+мілдронат	0,0262±0,0020#	0,0211±0,0020#	0,0283±0,0025#
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН	0,0448±0,0038**	0,0311±0,0022*	0,0437±0,0035**
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН+мілдронат	0,0257±0,0018#	0,0222±0,0021#	0,0273±0,0019#

ність впливу мілдронату на вільнорадикальні реакції в організмі уражених щурів, зокрема на процеси ліпопероксидації. Ми вивчили вміст ТБК-АП у сироватці крові, легенях та міокарді тварин після отруєння їх НН і ТД за умов застошування мілдронату (табл. 3).

Ураження ТД викликало вірогідне підвищення вмісту ТБК-АП у сироватці крові, легенях та міокарді щурів усіх вікових груп. Найчутливішими до ТД виявились легені статевонезрілих щурів, вміст ТБК-АП у яких збільшився у 2,4 раза. У цей час даний показник у старечих щурів збільшився у 2,3 раза, у статевозрілих – у 2 рази.

Після введення в організм токсикованим димом щурів натрію нітриту вміст ТБК-АП у кінці експерименту (45-та доба ураження ТД+72 год отруєння НН) підвищився: у 4,3 раза – в легенях статевонезрілих щурів, у 3,75 раза – у статевозрілих, у 3,6 раза – у старечих.

Найбільш чутливим до дії ТД виявився міокард статевонезрілих щурів, у якому вміст

ТБК-АП підвищився у 3,4 раза після 45-денного ураження. Після введення в організм додаткового токсиканта в міокарді статевонезрілих щурів цей показник зріс у 12,3 раза, тоді як у статевозрілих він у 8 разів, у старечих – у 7,3 раза перевищував рівень інтактних тварин.

Мілдронат, який ми застосували як коригувальний чинник, проявив позитивний вплив на вміст продуктів ліпопероксидації у всіх досліджуваних тканинах. В останній термін дослідження цей показник після використання мілдронату зменшився в 1,6 раза у сироватці статевонезрілих і старечих щурів та в 1,3 раза у статевозрілих тварин порівняно з ураженими токсикантами щурами. Після застосування мілдронату аналогічне зменшення вмісту ТБК-АП відмічали в легенях щурів, найбільш вираженим воно було у старечих тварин (в 2,4 раза нижче рівня уражених). Мілдронат проявив позитивний вплив на міокард уражених ТД та НН тварин – в усіх вікових групах у кінці експерименту вміст ТБК-АП

Таблиця 3 – Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові (мкмоль/л) та органах (мкмоль/кг) щурів різного віку, уражених натрію нітритом на тлі 45-денної інтоксикації тютюновим димом і після застосування мілдронату ( $M \pm m$ ,  $n=108$ )

Термін дослідження, доба	Група піддослідних тварин		
	статевонезрілі щури	статевозрілі щури	старечі щури
	Сироватка крові		
Інтактні щури	3,28±0,23	1,85±0,14	2,35±0,14
45-та доба ураження ТД	6,62±0,08***	3,94±0,27**	4,23±0,17***
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН	6,87±0,35***	6,42±0,43***	6,43±0,48***
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН+мілдронат	5,07±0,24 <sup>#</sup>	4,45±0,17 <sup>#</sup>	4,77±0,25 <sup>#</sup>
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН	16,43±0,39***	14,93±0,34***	12,28±0,50***
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН+мілдронат	10,50±0,36***	11,07±0,29***	7,48±0,19***
	Легені		
Інтактні щури	18,66±0,60	21,82±1,51	21,36±2,13
45-та доба ураження ТД	44,87±2,34***	43,69±3,61**	48,61±2,17***
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН	53,41±3,10***	56,83±2,51***	58,11±1,45***
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН+мілдронат	23,18±1,02***	28,84±1,57***	37,92±1,33***
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН	79,70±2,10***	81,83±1,75***	77,13±2,76***
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН+мілдронат	47,46±2,25***	41,77±2,00***	32,58±1,81***
	Міокард		
Інтактні щури	9,72±0,65	13,35±0,98	13,35±1,28
45-та доба ураження ТД	33,33±2,34***	24,04±1,52**	22,11±1,25**
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН	58,75±3,17***	35,46±2,18***	37,28±2,62***
45-та доба ураження ТД+ 24 год отруєння НН+мілдронат	20,40±1,51***	22,11±1,45***	15,06±0,95***
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН	119,79±1,70***	106,30±1,87***	98,50±1,01***
45-та доба ураження ТД+ 72 год отруєння НН+мілдронат	44,42±1,38***	38,80±0,99***	36,77±1,16***



знизились в 2,7 рази відносно рівня уражених щурів.

Недостатність споживання організмом кисню може виникнути з різних причин, зокрема внаслідок розладів зовнішнього дихання та транспортної функції крові, порушення системного і регіонарного кровообігу, мікроциркуляції, ендотоксемії [24]. Порушення метаболізму – один із найбільш характерних проявів гіпоксії. Важливими ферментами-маркерами, які використовують для оцінки енергетичного обміну та перебігу гіпоксії, є сукцинатдегідрогеназа і цитохромоксидаза [25, 26], активність яких ми визначали в легенях та міокарді щурів після їх ураження ТД і НН, а також після застосування мілдронату. На рисунку 1 наведено результати вивчення активності СДГ у легенях щурів, уражених ТД і НН, та після використання досліджуваного коригувального чинника.

Після ураження щурів усіх вікових груп ТД активність СДГ вірогідно знижувалась у легенях тварин. Введення в токсикований димом організм НН поглибило токсичний вплив ксенобіотиків на процеси мітохондріального окиснення, активність СДГ у легенях зазнала ще більш вираженого зменшення.

Мілдронат проявив ефективний вплив на цей фермент, підвищуючи його активність у легенях

тварин усіх груп у кінці експерименту (в статевонезрілих – на 28 %, у статевозрілих – на 25 %, у старечих – на 21 %).

Аналогічні дані ми отримали, досліджуючи міокард уражених щурів (рис. 2).

Через 72 год після введення НН токсикованим димом щурам активність СДГ у міокарді знизилась у всіх вікових групах практично до одного рівня і становила 46–49 % від рівня інтактних тварин. Застосування мілдронату було ефективним для цього показника в міокарді. Найбільш виражений вплив проявив антигіпоксикант на міокард статевозрілих щурів, активність СДГ у них сягнула практично рівня інтактних тварин (98 %). У старечих щурів відмічено активність СДГ у міокарді на рівні 90 %, у статевонезрілих – на рівні 85 % від норми. Отримані результати підтверджують антигіпоксикантні властивості мілдронату.

При дослідженні активності цитохромоксидази ми відмітили її зниження після ураження ТД в усіх групах тварин (табл. 4).

У легенях статевонезрілих щурів активність ЦО після 45-денного ураження ТД знизилась у 2 рази, у статевозрілих – в 1,75 рази, у старечих – в 1,8 рази. Після інтоксикації димом активність цього ферменту в міокарді зменшилась в 1,2–1,3 рази у всіх піддослідних тварин. Зниження

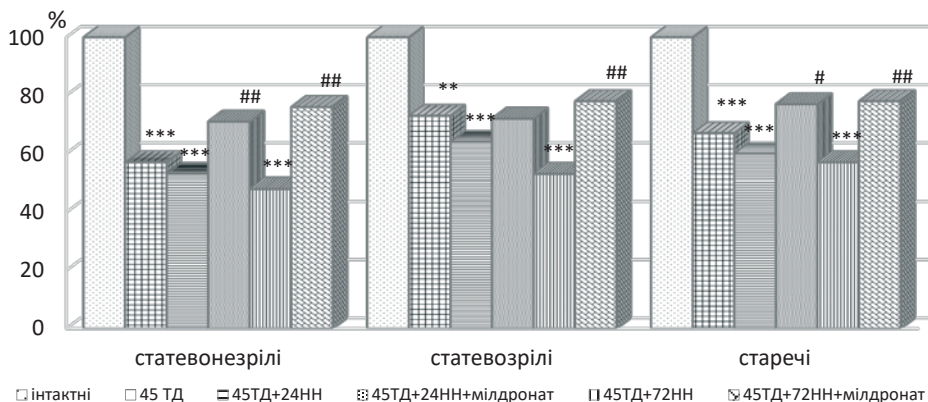


Рис. 1. Активність сукцинатдегідрогенази (%) у легенях токсикованих щурів після застосування мілдронату.

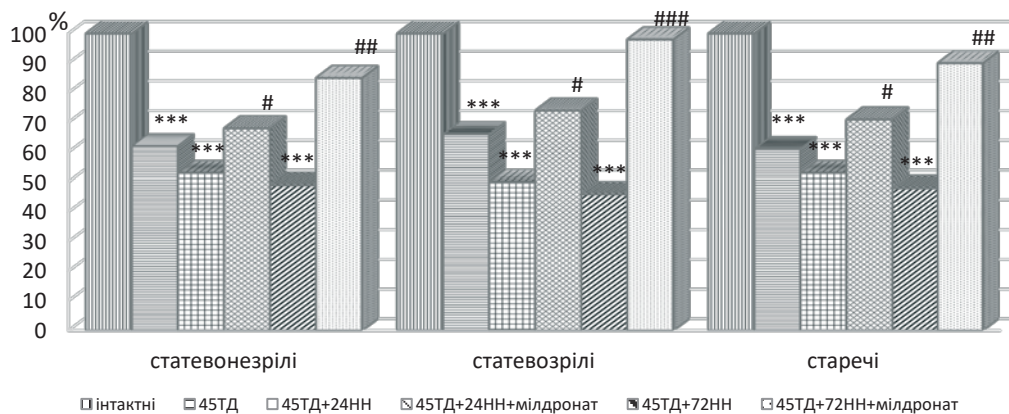


Рис. 2. Активність сукцинатдегідрогенази (%) у міокарді токсикованих щурів після застосування мілдронату.

Таблиця 4 – Активність цитохромоксидази в міокарді та легенях (мкмоль/кг·хв) щурів різного віку, уражених натрію нітритом на тлі 45-денної інтоксикації тютюновим димом і після застосування мілдронату ( $M \pm m$ ,  $n=108$ )

Термін дослідження, доба	Група піддослідних тварин		
	статевонезрілі щури	статевозрілі щури	старечі щури
	Легені		
Інтактні щури	32,03±0,89	34,45±0,66	32,63±0,66
45-та доба ураження	15,71±0,76***	19,63±0,55***	18,13±0,66***
45-та доба ураження ТД+ 24 год НН	12,08±0,01***	15,71±0,60***	12,39±0,56***
45-та доба ураження ТД+ 24 год НН+мілдронат	26,59±0,76###	29,91±0,77###	27,50±0,56###
45-та доба ураження ТД+ 72 год НН	12,69±1,04***	17,41±0,71***	13,00±0,98***
45-та доба ураження ТД+ 72 год НН+мілдронат	26,59±1,01###	29,61±0,89###	27,50±0,86###
Інтактні щури	Міокард		
	статевонезрілі щури	статевозрілі щури	старечі щури
	Легені		
Інтактні щури	41,70±1,55	45,93±1,79	38,98±1,30
45-та доба ураження	31,71±1,43*	38,58±1,02*	30,38±1,88*
45-та доба ураження ТД+ 24 год НН	23,46±1,18***	25,38±0,66***	20,85±0,91***
45-та доба ураження ТД+ 24 год НН+мілдронат	34,75±0,56###	35,96±0,86###	34,14±0,56###
45-та доба ураження ТД+ 72 год НН	23,27±0,55***	26,29±0,91***	17,52±0,90***
45-та доба ураження ТД+ 72 год НН+мілдронат	33,24±0,60###	34,76±1,42##	33,65±0,41###

активності ЦО ще більш вираженим було після отруєння токсикованих димом щурів НН. У легенях статевонезрілих та старечих тварин після ураження обома токсикантами в кінці експерименту активність ЦО знизилась у 2,5 раза, у статевозрілих – у 2 рази. Найбільш чутливим до дії обох токсикантів виявився міокард старечих щурів. Активність ЦО у тварин цієї групи зменшилась у 2,2 раза, тоді як у двох інших вікових групах – в 1,7–1,8 раза.

Після застосування мілдронату активність ЦО у легенях тварин усіх вікових груп зазнала вірогідного підвищення, але рівня норми ще не досягла навіть у кінці дослідження. Найбільш ефективний вплив мілдронату проявив у міокарді уражених старечих тварин. Активність ензиму в їх міокарді зросла в 1,9 раза порівняно з групою уражених токсикантами щурів. У двох інших групах піддослідних тварин активність ЦО підвищилась у 1,3–1,4 раза порівняно з ураженими щурами.

Отже, ми відмітили позитивний вплив мілдронату на ензими мітохондріального окиснення в щурів після їх ураження ТД та НН, що є проявом антигіпоксантичних властивостей досліджуваного коригувального засобу.

**ВИСНОВКИ.** В експерименті на щурах різних вікових груп, отруєних натрію нітритом на тлі 45-денної інтоксикації тютюновим димом, вста-

новлено збільшення у крові вмісту карбокси- та метгемоглобіну, що призводить до виникнення змішаної гіпоксії після ураження. Це супроводжується активацією процесів ліпопероксидації, на що вказує підвищений вміст ТБК-активних продуктів в органах уражених тварин. Гіпоксія та активація вільнорадикальних реакцій при ураженні зумовлюють порушення функціонування процесів мітохондріального окиснення. Відмічено зниження активності біоенергетичних ензимів, зокрема сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази, в легенях та міокарді тварин, уражених натрію нітритом на тлі інтоксикації тютюновим димом. Більш чутливими до токсикантів виявились щури статевонезрілого та старечого віку.

Мілдронат проявляє ефективний вплив на активність вільнорадикальних процесів в ураженому організмі, знижуючи вміст метгемоглобіну в крові й ТБК-активних продуктів в органах після ураження, а також після його застосування у крові зменшується вміст карбоксигемоглобіну, що запобігає розвитку гіпоксії, зумовленої тютюнокурінням та отруєнням нітратами. Це приводить до відновлення функціонування ланцюга мітохондріального окиснення, на що вказує підвищення активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази. Отримані результати підтверджують антигіпоксантичні властивості мілдронату.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fariheen A. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes / A. Fariheen, N. Shaikh, M. Riaz // *Toxicology in Vitro*. – 2015. – **29** № 7. – P. 1878–1886.
2. Cai Z. Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health / Z. Cai, Yan Liang-Jun // *J. Biochem. Pharmacol. Res.* – 2013. – № 1. – P. 15–26.
3. Harvey M. Fatal methaemoglobinemia induced by self-poisoning with sodium nitrite. / M. Harvey, G. Cave, G. Chanwai // *Emerg. Med. Australas.* – 2010. – **22**, № 5. – P. 463–465.
4. Katabami K. Severe methemoglobinemia due to sodium nitrite poisoning / K. Katabami, M. Hayakawa, S. Gando // *Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Emergency Medicine*. – 2016. – 3 pages.
5. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide / G. D'Amico, F. Lam, T. Hagen, S. Moncada // *J. Cell Sci.* – 2006. – **119**, № 11. – P. 2291–2298.
6. May J. Nitrite generates an oxidant stress and increases nitric oxide in EA.hy926 endothelial cells / J. May, Z. Qu, X. Li // *Free Radic. Res.* – 2004. – **38**, № 6. – P. 581–589.
7. Oxidative and pro-inflammatory impact of regular and denicotinized cigarettes on blood brain barrier endothelial cells: is smoking reduced or nicotine-free products really safe? / P. Naik, N. Fofaria, S. Prasad [et al.] // *BMC Neurosci.* – 2014. – **51**, № 15. – P. 1–14.
8. Gilchrist M. Inorganic nitrate and nitrite and control of blood pressure / M. Gilchrist, A. Shore, N. Benjamin // *Cardiovasc. Res.* – 2011. – **89**, № 3. – P. 492–498.
9. Toxicity of cigarette smoke on isolated lung, heart, and brain mitochondria: induction of oxidative stress and cytochrome c release / M.-J. Hosseini, P. Naserzadehb, A. Salimic, J. Pourahmad // *Toxicological & Environmental Chemistry*. – 2014. – **95**, № 9. – P. 1624–1637.
10. A comparison of toxicity mechanisms of cigarette smoke on isolated mitochondria obtained from rat kidney and eye / P. Naserzadeh, M.-J. Hosseini, S. Arbabi, J. Pourahmad // *Iran. J. Pharm. Sci.* – 2013. – № 9. – P. 55–62.
11. Eissenberg T. Waterpipe tobacco and cigarette smoking direct comparison of toxicant exposure / T. Eissenberg, A. Shihadeh // *Am. J. Prev. Med.* – 2009. – **37**, № 6. – P. 518–523.
12. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking / A. Csizsar, A. Podlutsky, M. Wolin [et al.] // *Front Biosci. (Landmark Ed)*. – 2009. – № 14. – P. 3128–3144.
13. Toxicity Mechanisms of Cigarette Smoke on Mouse Fetus Mitochondria / P. Naserzadeh, M.-J. Hosseini, Asl. B. Mohamadzadeh, J. Pourahmad // *Iran J. Pharm. Res.* – 2015. – № 14. – P. 131–138.
14. Титов В. Ю. Предполагаемый механизм развития нитрит-индуцированной метгемоглобинемии / В. Ю. Титов, Ю. М. Петренко // *Биохимия*. – 2005. – **70**, № 4. – С. 575–587.
15. Апаратно-програмний комплекс для неінвазивного діагностування карбоксигемоглобіну в потоках крові / Д. В. Велигоцький, Н. В. Стельмах, С. С. Єсьман, С. О. Мамілов // *Інформаційні системи і технології*. – 2012. – № 1 (72), ч. 1. – С. 71–74.
16. Луцак В. І. Показники оксидативного стресу. 2. Пероксиди ліпідів / В. І. Луцак, Т. В. Багнюкова, Л. І. Лужна // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 5. – С. 113–119.
17. Jones A. A spectrophotometric coupled enzyme assay to measure the activity of succinate dehydrogenase / J. Jones // *Anal. Biochem.* – 2013. – **442**, № 1. – P. 19–23.
18. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited / F. Appaix, M. Minatchy, C. Riva-Lavieille [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2000. – **1457**, № 3. – P. 175–181.
19. Gross D. Ethics in animal-based research / D. Gross, R. Tolba // *European Surgical Research*. – 2015. – **55**, № 1–2. – P. 43–57.
20. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: Морион, 2001. – 408 с.
21. Recurrent carbon monoxide poisoning from cigarette smoking / S. Sen, C. Peltz, J. Beard, B. Zeno // *Am. J. Med. Sci.* – 2015. – **340**, № 5. – P. 427–428.
22. Group waterpipe tobacco smoking increases smoke toxicant concentration / C. Ramoa, A. Shihadeh, R. Salman, T. Eissenberg // *Nicotine Tob. Res.* – 2016. – **18**, № 5. – P. 770–776.
23. Rasmussen D. Severe recurrent carbon monoxide poisoning caused by smoking / D. Rasmussen, V. Jacobsen // *Ugeskr Laeger*. – 2015. – **177**, № 2. – P. 78–79.
24. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology / E. Van Faassen, S. Bahrami, M. Feelisch [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2009. – **29**. – P. 683–741.
25. Cytochrome c oxidase maintains mitochondrial respiration during partial inhibition by nitric oxide / M. Palacios-Callender, V. Hollis, N. Frakich [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2007. – **120**, № 1. – P. 160–165.
26. Navarro A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process / A. Navarro, A. Boveris // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – **292**, № 2. – P. 670–686.

## REFERENCES

1. Fariheen, A., Shaikh N., & Riaz, M. (2015). Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 29 (7), 1878-1886. doi:10.1016/j.tiv.2015.07.022
2. Cai, Z., & Yan Liang-Jun. (2013). Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J. Biochem. Pharmacol. Res.*, 1, 15-26.



3. Harvey, M., Cave, G., & Chanwai, G. (2010). Fatal methaemoglobinaemia induced by self-poisoning with sodium nitrite. *Emerg. Med. Australas.*, 22 (5), 463-465. doi: 10.1111/j.1742-6723.2010.01335.x.
4. Katabami, K., Hayakawa, M. & Gando, S. (2016). Severe methemoglobinemia due to sodium nitrite poisoning. *Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Emergency Medicine*, 3 pages doi:10.1155/2016/9013816.
5. D'Amico, G., Lam, F., Hagen, T., & Moncada, S. (2006). Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J. Cell Sci.*, 119 (11), 2291-8. DOI: 10.1242/jcs.02914.
6. May, J., Qu, Z., & Li, X. (2004). Nitrite generates an oxidant stress and increases nitric oxide in EA.hy926 endothelial cells. *Free Radic. Res.*, 38 (60), 581-589.
7. Naik, P., Fofaria, N., Prasad, S. Sajja, R., Weksler, B., & Couraud, P. (2014). Oxidative and pro-inflammatory impact of regular and denicotinized cigarettes on blood brain barrier endothelial cells: is smoking reduced or nicotine-free products really safe? *BMC Neurosci.*, 15 (15), 1-14. doi: 10.1186/1471-2202-15-51.
8. Gilchrist, M., Shore, A., & Benjamin, N. (2011). Inorganic nitrate and nitrite and control of blood pressure. *Cardiovasc. Res.*, 89 (3), 492-498. doi: 10.1093/cvr/cvq309.
9. Eissenberg, T., & Shihadeh, A. (2009). Waterpipe tobacco and cigarette smoking direct comparison of toxicant exposure. *Am. J. Prev. Med.*, 37 (6), 518-523. doi: 10.1016/j.amepre.2009.07.014.
10. Hosseini, M.-J., Naserzadeh, P., Salimic, A., & Pourahmad, J. (2014). Toxicity of cigarette smoke on isolated lung, heart, and brain mitochondria: induction of oxidative stress and cytochrome c release. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95 (9), 1624-1637. doi.org/10.1080/02772248.2014.884206
11. Naserzadeh, P., Hosseini, M.-J., Arbabi, S., & Pourahmad, J. (2013). A comparison of toxicity mechanisms of cigarette smoke on isolated mitochondria obtained from rat kidney and eye. *Iran. J. Pharm. Sci.*, 9, 55-62.
12. Csiszar, A., Podlutzky, A Wolin, M., Losonczy, G., Pacher, P., & Ungvari, Z. (2009). Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci. (Landmark Ed)*, 14, 3128-3144.
13. Naserzadeh, P., Hosseini, M.-J., Mohamadzadeh Asl, B., & Pourahmad, J. (2015). Toxicity Mechanisms of Cigarette Smoke on Mouse Fetus Mitochondria. *Iran J. Pharm. Res.*, 14, 131-138.
14. Titov, V. & Petrenko, Yu. (2005). Predpolagayemyy mekhanizm razvitiya nitrit-indutsirovannoy metgemoglobinemii [The proposed mechanism for the development of nitrite-induced methemoglobinemia]. *Biokhimiya – Biochemistry*, 70 (4), 575-587 [in Russian].
15. Velyhotskyi, D., Stelmakh, N., Yesman, S., & Mamilov, S. (2012). Aparatno-prohramnyi kompleks dlia neinvazyvnoho diahnostuvannia karboksyhemoglobinu v potokakh krovi [Hardware and software complex for non-invasive diagnosis of carboxyhemoglobin in blood flows]. *Informatsiini systemy i tekhnologii – Information systems and technologies*, 72 (1), 71-74 [in Ukrainian].
16. Lushchak, V., Bahnyukova, T., & Luzhna, L. (2006). Pokaznyky oksydatyvnoho stresu peroksydy lipidiv [Indicators of oxidative stress. Lipid peroxides]. *Ukr. biokhim. zhurn. – Ukrainian Biochemistry Journal*, 78 (5), 113-119 [in Ukrainian].
17. Jones, A. (2013). A spectrophotometric coupled enzyme assay to measure the activity of succinate dehydrogenase. *Anal. Biochem.*, 442 (1), 19-23. doi: 10.1016/j.ab.2013.07.018.
18. Appaix, F., Minatchy, M., Riva-Lavieille, C., Olivares, J., Antonsson, B., & Saksm V. (2000). Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1457 (3), 175-181. doi: 10.1016/s0005-2728(00)00098-0.
19. Gross, D., & Tolba, R. (2015). Ethics in animal-based research. *European Surgical Research*, 55 (1-2), 43-57. doi: 10.1159/000377721.
20. Lapach, S., Chubenko, A. & Babich, P. (2001). *Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniyem Eksel [Statistical methods in medical and biological studies using Excel]*. Kyiv: Morion [in Russian].
21. Sen, S., Peltz, C., Beard, J. & Zeno. B. Recurrent carbon monoxide poisoning from cigarette smoking. *Am. J. Med. Sci.*, 340 (5), 427-428. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3181ef712d.
22. Ramoa, C., Shihadeh, A., Salman, R., & Eissenberg, T. (2016). Group waterpipe tobacco smoking increases smoke toxicant concentration. *Nicotine Tob Res.*, 18 (5), 770-6. doi: 10.1093/ntr/ntv271.
23. Rasmussen, D., & Jacobsen, V. (2015). Severe recurrent carbon monoxide poisoning caused by smoking. *Ugeskr. Laeger.*, 177 (2), 78-79.
24. Van Faassen, E., Bahrami, S., Feelisch, M., Hogg, N., Kelm, M., Kim-Shapiro, D., Kozlov, A., Li, H., Lundberg, J., Mason, R., Nohl, H., Rassaf, T., Samouilov, A., Slama-Schwok, A., Shiva, S., Vanin, A., Weitzberg, E., Zweier, J., & Gladwin, M. (2009). Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med. Res. Rev.*, 29, 683-741. doi: 10.1002/med.20151.
25. Palacios-Callender, M., Hollis, V., Frakich, N., Mateo, J., & Moncada, S. (2007). Cytochrome c oxidase maintains mitochondrial respiration during partial inhibition by nitric oxide. *J. Cell Sci.*, 120 (1), 160-165. doi: 10.1242/jcs.03308.
26. Navarro, A., & Boveris, A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 292 (2), 670-686. doi:10.1152/ajpcell.00213.2006.



## КОРРЕКЦИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У КРЫС, ОТРАВЛЕННЫХ НАТРИЯ НИТРИТОМ И ТАБАЧНЫМ ДЫМОМ, ПРЕПАРАТОМ “МИЛДРОНАТ”

### Резюме

**Вступление.** По оценке ВОЗ, курение занимает второе место в списке причин, которые вызывают преждевременную гибель людей. Заинтересованность в выяснении механизмов воздействия на организм нитритов и нитратов и звеньев патогенеза гемической гипоксии, которая при этом возникает, обусловлена их широким использованием в промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Поэтому исследование сочетанного влияния нескольких ксенобиотиков на организм является целесообразным и актуальным.

**Цель исследования** – оценить эффективность использования антигипоксанта “Милдронат” и его влияние на окислительные и биоэнергетические процессы в организме крыс разного возраста, пораженных натрием нитритом на фоне 45-дневной табачной интоксикации.

**Методы исследования.** В условиях поражения крыс разного возраста натрием нитритом на фоне табачной интоксикации в крови определяли содержание мет- и карбоксигемоглобина. Активность процессов липопероксидации оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов в сыворотке крови, легких и миокарде подопытных животных, функционирование биоэнергетических процессов – по активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что поражение крыс разных возрастных групп натрием нитритом (за 24 и 72 ч до окончания эксперимента) на фоне 45-дневной интоксикации табачным дымом приводило к активации процессов свободнорадикального окисления, на что указывало увеличение содержания метгемоглобина в крови пораженных животных и ТБК-активных продуктов в сыворотке крови, легких и миокарде после отравления. Одновременно в крови возрастало содержание карбоксигемоглобина. В организме возникала смешанная гипоксия (гемическая и циркуляторная), которая приводила к нарушению функционирования митохондриальной цепи окисления. Наиболее чувствительными к действию исследуемых токсикантов оказались неполовозрелые крысы, в миокарде старческих животных наблюдали достоверные изменения активности митохондриальных энзимов после поражения, которые были более выражены по сравнению с другими возрастными группами крыс. С целью коррекции выявленных нарушений применен препарат метаболического действия с антигипоксантами свойствами “Милдронат”, который положительно повлиял на активность процессов липопероксидации и активность митохондриальных энзимов в условиях гипоксии.

**Вывод.** Полученные результаты указывают на целесообразность включения милдроната в комплексное лечение отравлений различного генеза.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** табачный дым; натрия нитрит; метгемоглобин; карбоксигемоглобин; липопероксидация; митохондриальные энзимы.

P. H. Lykhatskyi

I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## CORRECTION OF FREE RADICAL PROCESSES AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN RATS POISONED BY SODIUM NITRITE AND TOBACCO SMOKE, MILDRONATE PREPARATION

### Summary

**Introduction.** According to the WHO, smoking takes the second place in the list of reasons that cause premature death of people. The interest in clarifying the mechanisms of action on the organism of nitrites and nitrates and the links of the pathogenesis of gemic hypoxia, which thus arises, is due to their widespread use in industry, agriculture and medicine. Therefore, the study of the combined effects of several xenobiotics on the body is feasible and relevant.

**The aim of the study** – to investigate the effectiveness of using antihypoxant Mildronate and its influence on the oxidative processes in the body of rats of different ages infected with sodium nitrite on the background of 45 days of tobacco intoxication.

**Research Methods.** Under the conditions of damage to rats of different ages, sodium nitrite on the background of tobacco intoxication was determined in the blood of the content of methemoglobin (MetHb) in reaction with acetone cyanadirin and carboxyhemoglobin (HbCO) in reaction with hexacyanone (III) potassium. The activity of lipoperoxidation processes was assessed by the content of TBA – active products (TBA – AP) in the serum of blood, lungs and myocardium of experimental animals. The evaluation of the functioning of the bioenergetic processes was carried out using the activity of succinate dehydrogenase (SAD), which was studied by the reaction of reduction of potassium ferricyanide, which solution has a yellow color, to colorless ferrocyanide of potassium succinate by the action of EDA and cytochrome oxidase (CO) by the oxidation reaction of dimethyl-n-phenylenediamine.

**Results and Discussion.** It has been established that the defeat of rats of different age groups by sodium nitrite (24 and 72 h before the end of the experiment) on the background of 45 days intoxication with tobacco smoke leads to the activation of free radical oxidation processes, indicating an increase in the content of methemoglobin in the blood of affected animals and TBA-AP in serum of blood, lungs and myocardium after poisoning. At the same time in the blood the content of carboxyhemoglobin increases. In the body, there is a mixed hypoxia (hemitic and circulatory), which leads to disturbances in the functioning of the mitochondrial oxidation chain. The most susceptible to the activity of toxicotoxins were immature animals, and in older animals there was a significant change in the activity of mitochondrial enzymes in the myocardium after the injury, which was more pronounced in comparison with other age groups of rats. In order to correct the revealed violations, a drug of metabolic action with antihypoxant properties of mildronate was used, which positively influenced the activity of lipoperoxidation processes and the activity of mitochondrial enzymes under hypoxia conditions.

**Conclusion.** The obtained results indicate the expediency of inclusion of mildronate in the complex treatment of poisonings of different genesis.

**KEY WORDS:** tobacco smoke; sodium nitrite; methemoglobin; carboxyhemoglobin; lipoperoxidation; mitochondrial enzymes.

Отримано 02.08.17

**Адреса для листування:** П. Г. Лихацький, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, майдан Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: luhatsky@tdmu.edu.ua.